

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/EP+ 99/05467
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP99/546709/762045



4

REC'D 26 NOV 1999
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen"

am 1. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf das Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben/Deutschland umgeschrieben worden.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung, von denen die Beschreibung, die Patentansprüche sowie die Abbildungen 1 bis 3 und 5 bis 7 am 1. Oktober 1998 und die Abbildung 4 am 10. Oktober 1998 eingegangen sind.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 01 H und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Jerofsky

Aktenzeichen: 198 45 216.0

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xy-
5 lulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine
p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von
Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll-
und/oder Carotinoid-Gehalt.
- 10 2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 und einer DNA-Se-
quenz SEQ ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Se-
quenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocope-
15 rolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Toco-
pherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt,
dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und
20 eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende
DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekenn-
zeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen
25 Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und 3 in eine
Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder
Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4,
30 dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des
Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder
der particle bombardment Methode erfolgt.
6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll-
35 und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskas-
sette gemäß Anspruch 4.
7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja,
Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

40

DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen

5

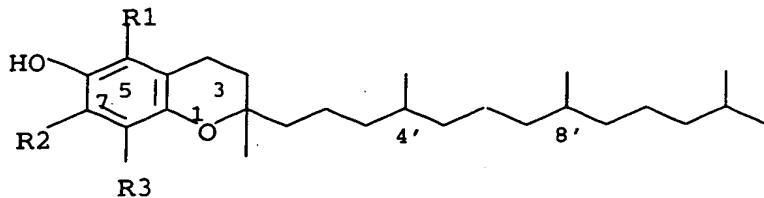
Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung von DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bis-her die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):

35



40 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

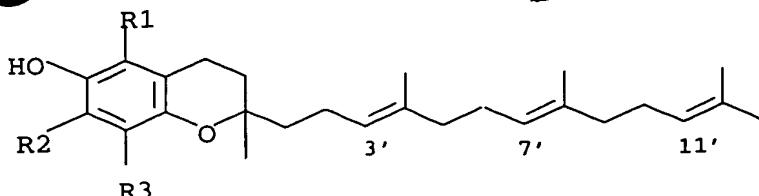
1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

45

5



- 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
 10 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$
 2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$
 2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

15

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können 20 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch 25 wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

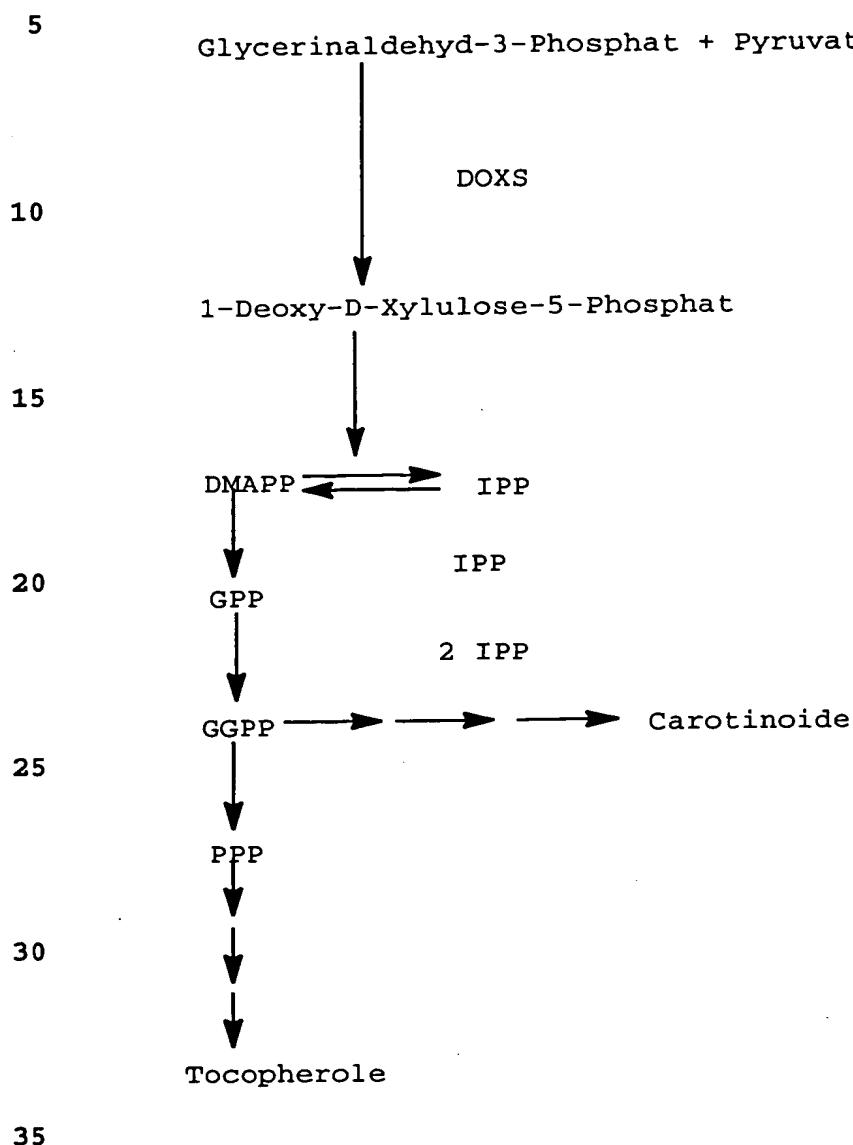
Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthese-30 segene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

35

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C₅-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B. Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf 40 Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-45 CoA Einheiten, die über β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C₅), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in

vivo Fütterungsexperimente mit C¹³ gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer 40 durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1), 129-134(1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 45 95(5), 2100-2104(1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3), 271-274(1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten

deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die 5 Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflußt ist (Bach und Lichtenthaler, Physiol. Plant 59(1993), 50-60). Der Mevalonat-un-abhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al., 1997).

10 IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C_{10}) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum 15 Sesquiterpen (C_{15}), Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C_{20}) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C_{40} -Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere 20 Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 30 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

35 In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktonal beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden 40 (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym 45 Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et

al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624 (1996)).

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

15 Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

20 Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli 25 erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer heterologer Gene erreicht werden. DOXS-Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

30 In einem Ausführungsbeispiel wird das DOXS-Gen aus E.coli (SEQ-ID No. 1; Rosa Putra et al., Tetrahedron Lett. 39(1998), 23-26; Acc. No. 035440) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten wird der E.coli DOXS in einem weiteren Konstrukt eine Transitsignalsequenz vorangestellt. 35 Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

Darüberhinaus verstärkt die Bildung von Homogentisinsäure den Metabolitfluss weiter in Richtung von Phytylquinonen und damit 45 Tocopherol, siehe Abbildung 1. Homogentisinsäure wird gebildet aus p-Hydroxyphenylpyruvat durch das Enzym p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD). cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden

aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 4 wurde erstmals das HPPD-Gen aus Streptomyces avermitilis (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 3) zusammen mit der DOXS aus E.coli in Pflanzen und pflanzlichen Plastiden überexprimiert.

Die Erhöhung der plastidären IPP Bildung führt zur verstärkten 10 Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung von Homogentisinsäure gewährleistet, daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen in den Plastiden zur Verfügung steht. Dieses nun vermehrt zur Verfügung stehende Homogentisat kann in den transgenen Pflanzen seinerseits mit der durch die 15 Überexpression der DOXS erhöhten Menge an Phytyldiphosphat (PPP) umgesetzt werden. PPP nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da es einerseits als Ausgangssubstrat für Chlorophylle und Phylloquinone, andererseits für Tocopherole dient.

20 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS- und das HPPD-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

25 Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3, die für eine DOXS bzw. HPPD oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/ 30 oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. HPPD kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

35 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende 40 der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. HPPD-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator 45 und ggf. weiterer regulatoriver Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der

kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, 5 im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

10 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- 15
- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopaline-Synthase-Promotor
 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet,
- 20 20 die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen 25 pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer 30 Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren 35 Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS- bzw. HPPD-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor 40 (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., 1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. HPPD-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungs-techniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792).

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translo-

kation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. HPPD-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. HPPD-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist 5 das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

10 Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

15 pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCACTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGGA

20 TCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCACTTTCCGGCCTTAA
25 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGCTG
GATCC_BamHI

pTP11

30 KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCACTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGGG
ATCC_BamHI

35

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS bzw. HPPD kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS bzw.

40 HPPD-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzen 45 zenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßiger-

weise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker ange- setzt werden.

5

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 10 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze 15 sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS- bzw. HPPD-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

20

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerreplace", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllung von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

30

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis 35 vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

40

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) 45 oder funktionelle Äquivalente.

11.12.01 10.12.01
Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz 5 KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen und ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium 10 tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die 15 Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 20 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens bzw. eines HPPD-Gens enthalten.

25 Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS und HPPD kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise 30 Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

35 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet 40 sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ ID No. 1 45 und SEQ ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des

Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- u. Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch 5 in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10 Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

15 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen

20 Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion 25 und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben.

30 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

35 Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf,

40 Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

45 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen bzw. HPPD-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichen- der Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen.

Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

5

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS bzw. HPPD kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen 10 Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS- bzw. HPPD-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen 15 kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise 25 der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS- und des HPPD-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS- bzw. HPPD-Aktivität aufweisen oder durch in 30 vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Compute- 35 rauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei 40 Bestandteil des Fusionsproteins ein DOXS- bzw. HPPD-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS- bzw. HPPD-Expression möglich 45 ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal-

oder Transitpeptid, das das DOXS- bzw. HPPD-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS- und des HPPD-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzeneneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS- und des HPPD-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS- und des HPPD-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS- und HPPD-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS und des HPPD-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 1 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart herge-

stellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Durch Überexpression der für eine HPPD kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

10 Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 1 und einer für die HPPD kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS und der HPPD erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegen-

15 stand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS und HPPD durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA Sequenzen.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer HPPD DNA-Sequenz in Pflanzen.

40 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

45 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gel-elektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von

Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

20

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Beispiel 1

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Escherichia coli* XL1 Blue

Eine Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zu nächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausge-

schüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

5 Beispiel 2

Isolierung der DOXS aus E. coli

Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für 10 eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktions-schnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende um-faßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTT-GATATTGCCAAATAC-3' (Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend 15 mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' bzw. 5'-ATG-GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI ent- 20 haltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli einge-setzt. Das PCR-Programm lautete:

- 25 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) 30 gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Se-quenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen ent-sprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das 35S Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 3 und 4 darge-stellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

- 40 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Vi-rus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Trans-45 ketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-ter-mination.

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus *E. coli* eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

- 10 Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 1). Dabei wurden zwei 15 nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

20 Beispiel 3

Klonierung des Gens einer HPPD aus *Streptomyces avermitilis* U11864

- 25 Isolierung genomicscher DNA des Bakteriums *Streptomyces avermitilis* U11864:

Eine Kultur von *Streptomyces avermitilis* U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für 30 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomicsche DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Unter-tisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die 40 Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al., 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das 5 Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGATCCAGCGGA- CAAGCCAAC-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-TCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

10

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlage wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

15 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) 20 gereinigt und nach Herstellerangeben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin), 25 vor dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al., 1994).

Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor 30 hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus 35 Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower- 40 Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984), 45 835-846) zur Transkriptionstermination.

Beispiel 4

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und HPPD-DNA-Sequenzen

5

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 7). Die Gensequenzen der DOXS und der HPPD wurden jeweils als BamHI-Fragmente wie in Beispiel 2 und 10 3 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungs-signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Der pBinAR-Hyg Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin 15 und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abge-20 leitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktions-schnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-25 CCGCGCCGCCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stop-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das 30 PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min

25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

35

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-40 Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR2-TP-HPPD (Abbildung 6).

45

Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR2-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination 5 mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors (kursiv geschrieben) anlagert, lautet 5'-ATAAGCTT-CATGGAGTCAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches 10 sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTTGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der 15 Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3). Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

20 Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde 25 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAA-CCGA-30 G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 1). Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984) übertragen.

Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, der wie oben beschrieben bereits die Sequenz der HPPD enthielt. Es entstand 40 das Konstrukt pBinAR-HPPD-DOXS (Abbildung 7), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437). Fragment B enthält das 45 Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,

1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS.

Beispiel 5

5

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränder-
ten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit
10 Sequenzen der DOXS und der HPPD transformiert. Zur Transformation
von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen
Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert,
der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen
15 Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen
Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser
ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend
wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige
und Skoog, Physiol. Plant (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und
20 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln
bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l
Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtylessigsäure
(NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kulti-
vierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt.
25 Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2%
Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

Beispiel 6

30 Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränder-
ten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Proto-
koll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants,
35 Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual,
Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammenset-
zungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens*
40 Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren
wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den
gesamten cDNAs der DOXS und der HPPD verwendet. In allen hier
verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz
durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-
45 Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermi-
nation ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol
oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H₂O gewaschen, in

1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit steriles H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur 5 Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-In- 10 duktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/1) angesetzt, davon 2 ml 15 in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ 20 von 0,3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobakterien- 25 Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums 30 gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

35 Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 40 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, 45 Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

24

Beispiel 7

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

5 Die cDNA der DOXS und der HPPD wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten trans-
10 formierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transforierten Pflanze erhöht.

15

20

25

30

35

40

45

26 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

GAC GAA CTG CGC CGC TAT TTA CTC GAC AGC GTG AGC CGT TCC AGC GGG
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

CAC TTC GCC TCC GGG CTG GGC ACG GTC GAA CTG ACC GTG GCG CTG CAC
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

TAT GTC TAC AAC ACC CCG TTT GAC CAA TTG ATT TGG GAT GTG GGG CAT
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

CAG GCT TAT CCG CAT AAA ATT TTG ACC GGA CGC CGC GAC AAA ATC GGC
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

ACC ATC CGT CAG AAA GGC GGT CTG CAC CCG TTC CCG TGG CGC GGC GAA
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

AGC GAA TAT GAC GTA TTA AGC GTC GGG CAT TCA TCA ACC TCC ATC AGT
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

GCC GGA ATT GGT ATT GCG GTT GCT GCC GAA AAA GAA GGC AAA AAT CGC
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

CGC ACC GTC TGT GTC ATT GGC GAT GGC GCG ATT ACC GCA GGC ATG GCG
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

TTT GAA GCG ATG AAT CAC GCG GGC GAT ATC CGT CCT GAT ATG CTG GTG
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

ATT CTC AAC GAC AAT GAA ATG TCG ATT TCC GAA AAT GTC GGC GCG CTC
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

AAC AAC CAT CTG GCA CAG CTG CTT TCC GGT AAG CTT TAC TCT TCA CTG
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

CGC GAA GGC GGG AAA AAA GTT TTC TCT GGC GTG CCG CCA ATT AAA GAG
Arg Glu Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

CTG CTC AAA CGC ACC GAA GAA CAT ATT AAA GGC ATG GTA GTG CCT GGC
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

ACG TTG TTT GAA GAG CTG GGC TTT AAC TAC ATC GGC CCG GTG GAC GGT
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
245 250 255 260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

CAC GAT GTG CTG GGG CTT ATC ACC ACG CTA AAG AAC ATG CGC GAC CTG
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
260 265 270 384 432 480 528 576 624 672 720 768 816 864

AAA GGC CCG CAG TTC CTG CAT ATC ATG ACC AAA AAA GGT CGT GGT TAT
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr

27	280	285	
275			
GAA CCG GCA GAA AAA GAC CCG ATC ACT TTC CAC GCC GTG CCT AAA TTT Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe			912
290	295	300	
GAT CCC TCC AGC GGT TGT TTG CCG AAA AGT AGC GGC GGT TTG CCG AGC Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser			960
305	310	315	320
TAT TCA AAA ATC TTT GGC GAC TGG TTG TGC GAA ACG GCA GCG AAA GAC Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp			1008
325	330	335	
AAC AAG CTG ATG GCG ATT ACT CCG GCG ATG CGT GAA GGT TCC GGC ATG Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met			1056
340	345	350	
GTC GAG TTT TCA CGT AAA TTC CCG GAT CGC TAC TTC GAC GTG GCA ATT Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile			1104
355	360	365	
GCC GAG CAA CAC GCG GTG ACC TTT GCT GCG GGT CTG GCG ATT GGT GGG Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly			1152
370	375	380	
TAC AAA CCC ATT GTC GCG ATT TAC TCC ACT TTC CTG CAA CGC GCC TAT Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr			1200
385	390	395	400
GAT CAG GTG CTG CAT GAC GTG GCG ATT CAA AAG CTT CCG GTC CTG TTC Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe			1248
405	410	415	
GCC ATC GAC CGC GCG GGC ATT GTT GGT GCT GAC GGT CAA ACC CAT CAG Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln			1296
420	425	430	
GGT GCT TTT GAT CTC TCT TAC CTG CGC TGC ATA CCG GAA ATG GTC ATT Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile			1344
435	440	445	
ATG ACC CCG AGC GAT GAA AAC GAA TGT CGC CAG ATG CTC TAT ACC GGC Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly			1392
450	455	460	
TAT CAC TAT AAC GAT GGC CCG TCA GCG GTG CGC TAC CCG CGT GGC AAC Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn			1440
465	470	475	480
GCG GTC GGC GTG GAA CTG ACG CCG CTG GAA AAA CTA CCA ATT GGC AAA Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys			1488
485	490	495	
GGC ATT GTG AAG CGT CGT GGC GAG AAA CTG GCG ATC CTT AAC TTT GGT Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly			1536
500	505	510	
ACG CTG ATG CCA GAA GCG GCG AAA GTC GCC GAA TCG CTG AAC GCC ACG Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr			1584
515	520	525	
CTG GTC GAT ATG CGT TTT GTG AAA CCG CTT GAT GAA GCG TTA ATT CTG			1632

28

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu			
530	535	540	
GAA ATG GCC GCC AGC CAT GAA GCG CTG GTC ACC GTA GAA GAA AAC GCC			1680
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala			
545	550	555	560
ATT ATG GGC GGC GCA GGC AGC GGC GTG AAC GAA GTG CTG ATG GCC CAT			1728
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His			
565	570	575	
CGT AAA CCA GTA CCC GTG CTG AAC ATT GGC CTG CCG GAC TTC TTT ATT			1776
Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile			
580	585	590	
CCG CAA GGA ACT CAG GAA GAA ATG CGC GCC GAA CTC GGC CTC GAT GCC			1824
Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala			
595	600	605	
GCT GGT ATG GAA GCC AAA ATC AAG GCC TGG CTG GCA TA			1863
Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala			
610	615	620	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 620 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser			
1	5	10	15
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys			
20	25	30	
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly			
35	40	45	
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His			
50	55	60	
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His			
65	70	75	80
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly			
85	90	95	
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu			
100	105	110	
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser			
115	120	125	
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg			
130	135	140	
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala			
145	150	155	160
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val			
165	170	175	
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu			

29

180

185

190

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
195 200 205
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
210 215 220
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
225 230 235 240
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
245 250 255
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
260 265 270
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
275 280 285
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
290 295 300
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
305 310 315 320
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
325 330 335
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
340 345 350
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
355 360 365
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
370 375 380
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385 390 395 400
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
405 410 415
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
420 425 430
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
435 440 445
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
450 455 460
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465 470 475 480
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
485 490 495
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
500 505 510
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
515 520 525
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
530 535 540
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
 565 570 575
 Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590
 Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605
 Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1469 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
- (B) STAMM: Streptomyces avermitilis
- (C) INDIVIDUUM ISOLAT: U11864

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 218..1138

(x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:

- (A) AUTORS: Reindl, Andreas
- (G) DATUM: 2000

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GATATCCGAG CGCCGCCGGG TCCACTGCGG TCCGAAGCCG CGGATGACTC CATTGACTG	60
AAGCCGGTCG AGCCGCGCCT GCACGGTGCC GCGCGCGACC CCGAGCCGCC GGGACATCTC	120
GAGCACTCCG ATGCGCGGCT CCCGCGCCAG CAGCACCAAGG AGCCGGCCGT CCAGATGATC	180
GATGCCACG GCAGCCCCCTC CAGTGGTCAT CCTGTAC ATG CAG CCC CAC GCC ATG	235
Met Gln Pro His Ala Met	

1	5
---	---

GGC GGT GCA CTG AAC ACA TTG TCC AGC GGA CAA GCC AAC TAT TGC GCA	283
Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly Gln Ala Asn Tyr Cys Ala	
10 15 20	

CCT TGC GGA ACG GAG CGA CCC TGC CGC CAT GAC GCA GAC CAC ACA CCA	331
Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His Asp Ala Asp His Thr Pro	
25 30 35	

CAC TCC CGA CAC CGC CCG GCA GGC CGA CCC CTT CCC GGT GAA GGG AAT	379
His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro Leu Pro Gly Glu Gly Asn	
40 45 50	

GGA CGC GGT CGT CTT CGC CGT AGG CAA CGC CAA GCA GGC CGC GCA CTA	427
Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg Gln Ala Gly Arg Ala Leu	
55 60 65 70	

CTC CAC CGC CTT CGG CAT GCA GCT TGT GGC GTA CTC CGG ACC GGA GAA	475
Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly Val Leu Arg Thr Gly Glu	
75 80 85	
CGG CAG CCG CGA GAC CGC TTC GTA CGT CCT CAC CAA CGG CTC GGC ACG	523
Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro His Gln Arg Leu Gly Thr	
90 95 100	
CTT CGT CCT CAC CTC CGT CAT CAA GCC CGC CAC CCC CTG GGG CCA CTT	571
Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg His Pro Leu Gly Pro Leu	
105 110 115	
CCT CGC CGA CCA TGT GGC CGA GCA CGG CGA CGG CGT CGT CGA CCT CGC	619
Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg	
120 125 130	
CAT CGA GGT CCC GGA CGC CCG CGC CGC CCA CGC GTA CGC GAT CGA GCA	667
His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro Arg Val Arg Asp Arg Ala	
135 140 145 150	
CGG CGC CCG CTC GGT CGC CGA GCC GTA CGA GCT GAA GGA CGA GCA CGG	715
Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg Ala Glu Gly Arg Ala Arg	
155 160 165	
CAC GGT CGT CCT CGC CGC GAT CGC CAC CTA CGG CAA GAC CCG CCA CAC	763
His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu Arg Gln Asp Pro Pro His	
170 175 180	
CCT CGT CGA CCG GAC CGG CTA CGA CGG CCC CTA CCT CCC CGG CTA CGT	811
Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro Leu Pro Pro Arg Leu Arg	
185 190 195	
GGC CGC CGC CCC GAT CGT CGA ACC GCC CGC CCA CCG CAC CTT CCA GGC	859
Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg Pro Pro His Leu Pro Gly	
200 205 210	
CAT CGA CCA CTG CGT CGG CAA CGT CGA GCT CGG CCG GAT GAA CGA ATG	907
His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala Arg Pro Asp Glu Arg Met	
215 220 225 230	
GGT CGG CTT CTA CAA CAA GGT CAT GGG CTT CAC GAA CAT GAA GGA GTT	955
Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu His Glu His Glu Gly Val	
235 240 245	
CGT GGG CGA CGA CAT CGC GAC CGA GTA CTC GGC GCT GAT GTC GAA GGT	1003
Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu Gly Ala Asp Val Glu Gly	
250 255 260	
CGT GGC CGA CGG CAC GCT CAA GGT CAA GTT CCC GAT CAA CGA GCC CGC	1051
Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val Pro Asp Gln Arg Ala Arg	
265 270 275	
CCT CGC CAA GAA GAA GTC CCA GAT CGA CGA GTA CCT GGA GTT CTA CGG	1099
Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg Val Pro Gly Val Leu Arg	
280 285 290	
CGG CGC GGG CGT CCA GCA CAT CGC GCT GAA CAC GGG TGACATCGTC	1145
Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu His Gly	
295 300 305	
GAGACGGTAC GCACGATGCG CGCCGCCGGC GTCCAGTTCC TGGACACGCC CGACTCGTAC	1205
TACGACACCC TCGGGGAGTG GGTGGCGAC ACCCGCGTCC CCGTCGACAC CCTGCGCGAG	1265

32.

CTGAAGATCC TCGGGGACCG CGACGAGGAC GGCTATCTGC CACAGATCTT CACCAAGCCG 1325
GTCCAGGACC GCCCGACGGT CTTCTTCGAG ATCATCGAAC GCCACGGCTC GATGGGATTC 1385
GGCAAGGGCA ACTTCAAGGC CCTGTTCGAG GCGATCGAGC GGGAGCAGGA GAAGCGGGC 1445
AACCTGTAGG CGGCGCGGCC CGGG 1469

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 306 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Gln Pro His Ala Met Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly
1 5 10 15
Gln Ala Asn Tyr Cys Ala Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His
20 25 30
Asp Ala Asp His Thr Pro His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro
35 40 45
Leu Pro Gly Glu Gly Asn Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg
50 55 60
Gln Ala Gly Arg Ala Leu Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly
65 70 75 80
Val Leu Arg Thr Gly Glu Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro
85 90 95
His Gln Arg Leu Gly Thr Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg
100 105 110
His Pro Leu Gly Pro Leu Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg
115 120 125
Arg Arg Arg Arg Pro Arg His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro
130 135 140
Arg Val Arg Asp Arg Ala Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg
145 150 155 160
Ala Glu Gly Arg Ala Arg His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu
165 170 175
Arg Gln Asp Pro Pro His Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro
180 185 190
Leu Pro Pro Arg Leu Arg Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg
195 200 205
Pro Pro His Leu Pro Gly His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala
210 215 220
Arg Pro Asp Glu Arg Met Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu
225 230 235 240
His Glu His Glu Gly Val Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu
245 250 255
Gly Ala Asp Val Glu Gly Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val
260 265 270
Pro Asp Gln Arg Ala Arg Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg
275 280 285

BASF Aktiengesellschaft

980734

O.Z. 0050/49415 DE

Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu
290 295 300
His Gly
305

Abbildung 1

Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels

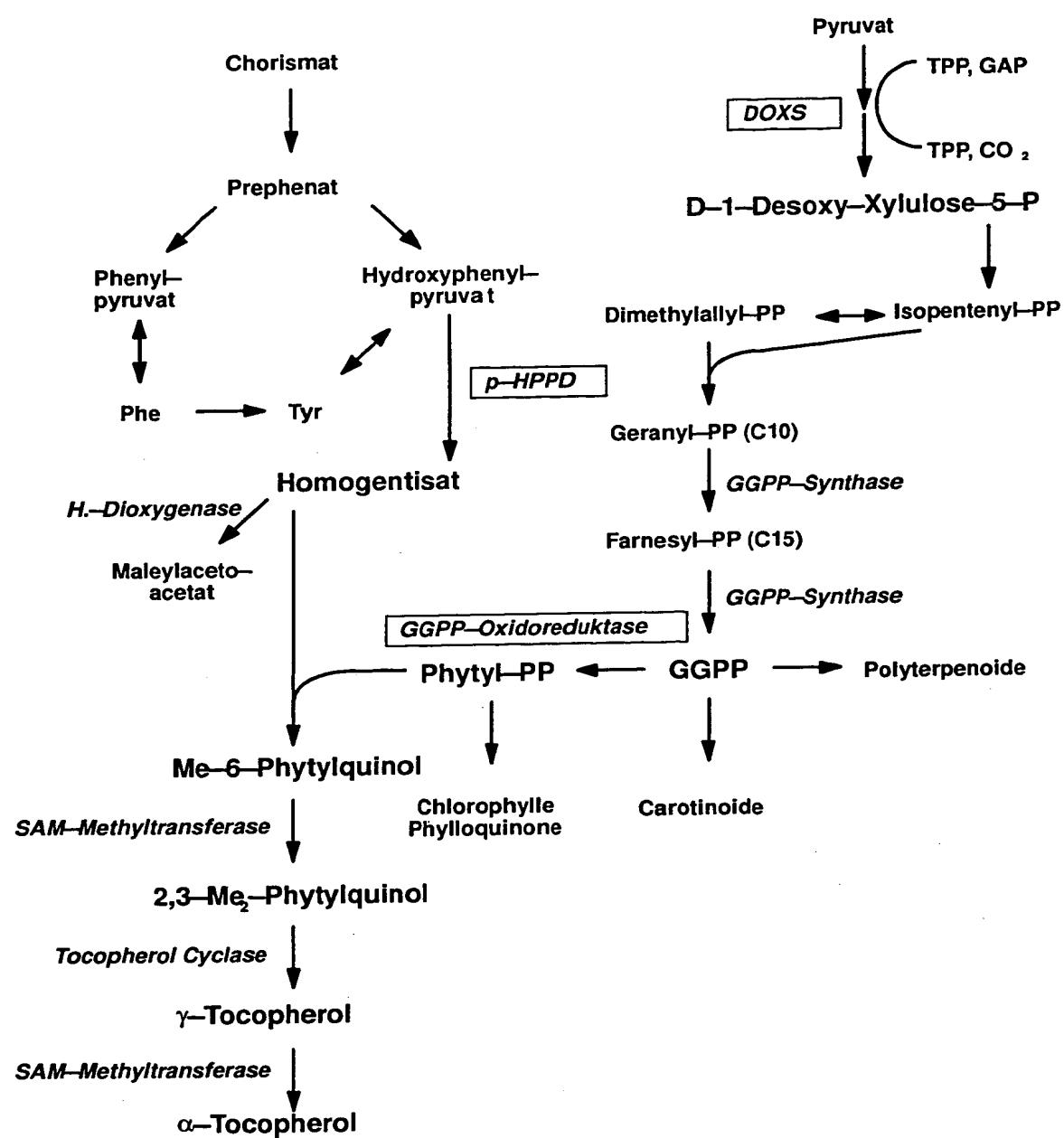
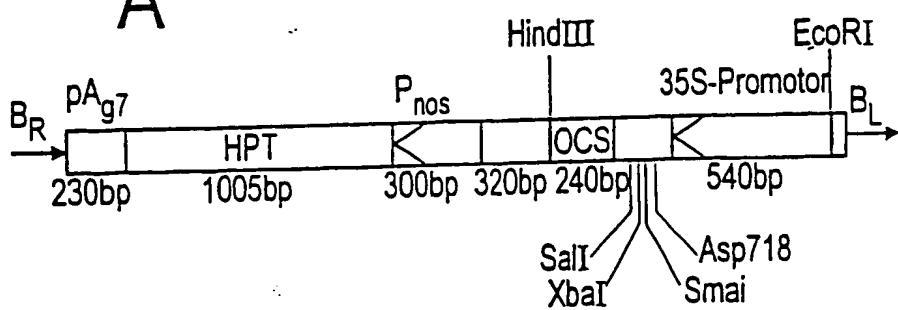


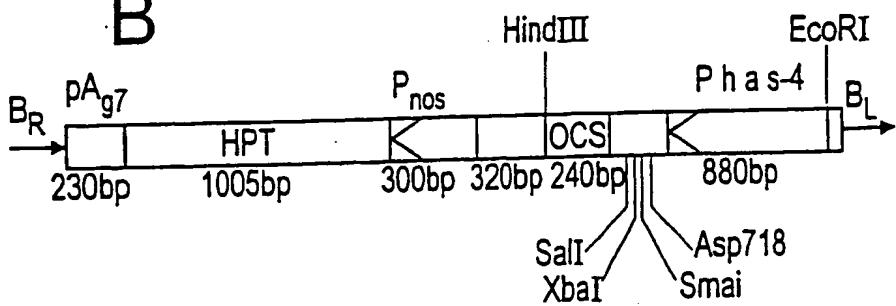
Abbildung 2

01 23.10.99

A



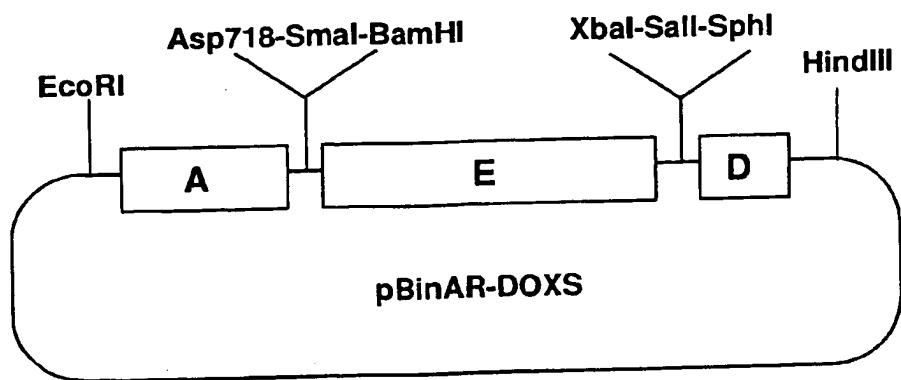
B



M 20.10.99

Abbildung

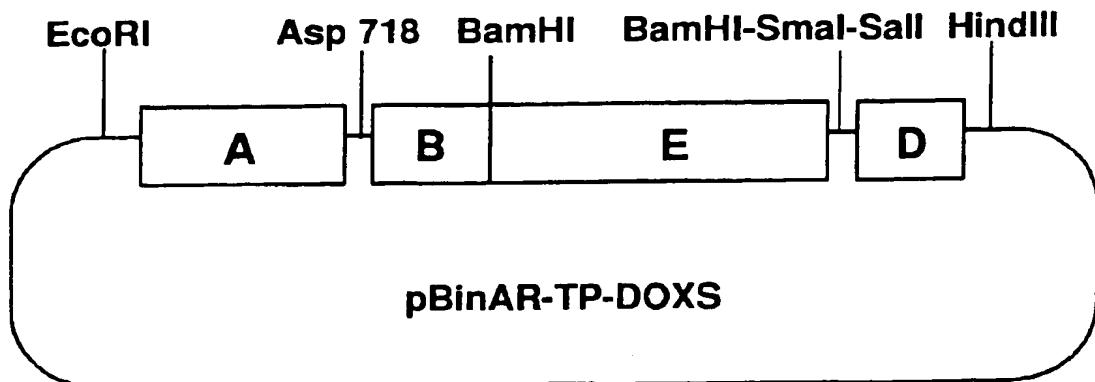
Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E.coli im
Zytosol transgener Pflanzen



01.23.10.99

Abbildung 4

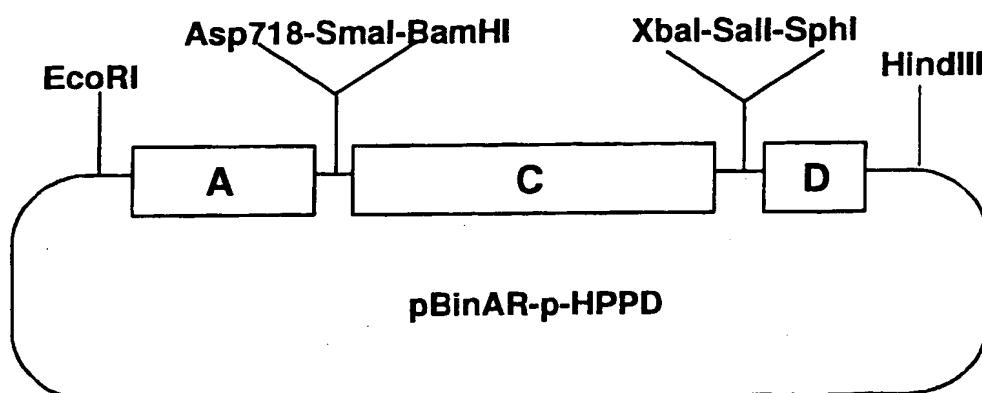
Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli in Plastiden transgener Pflanzen.



M 23. 10. 99

Abbildung 5

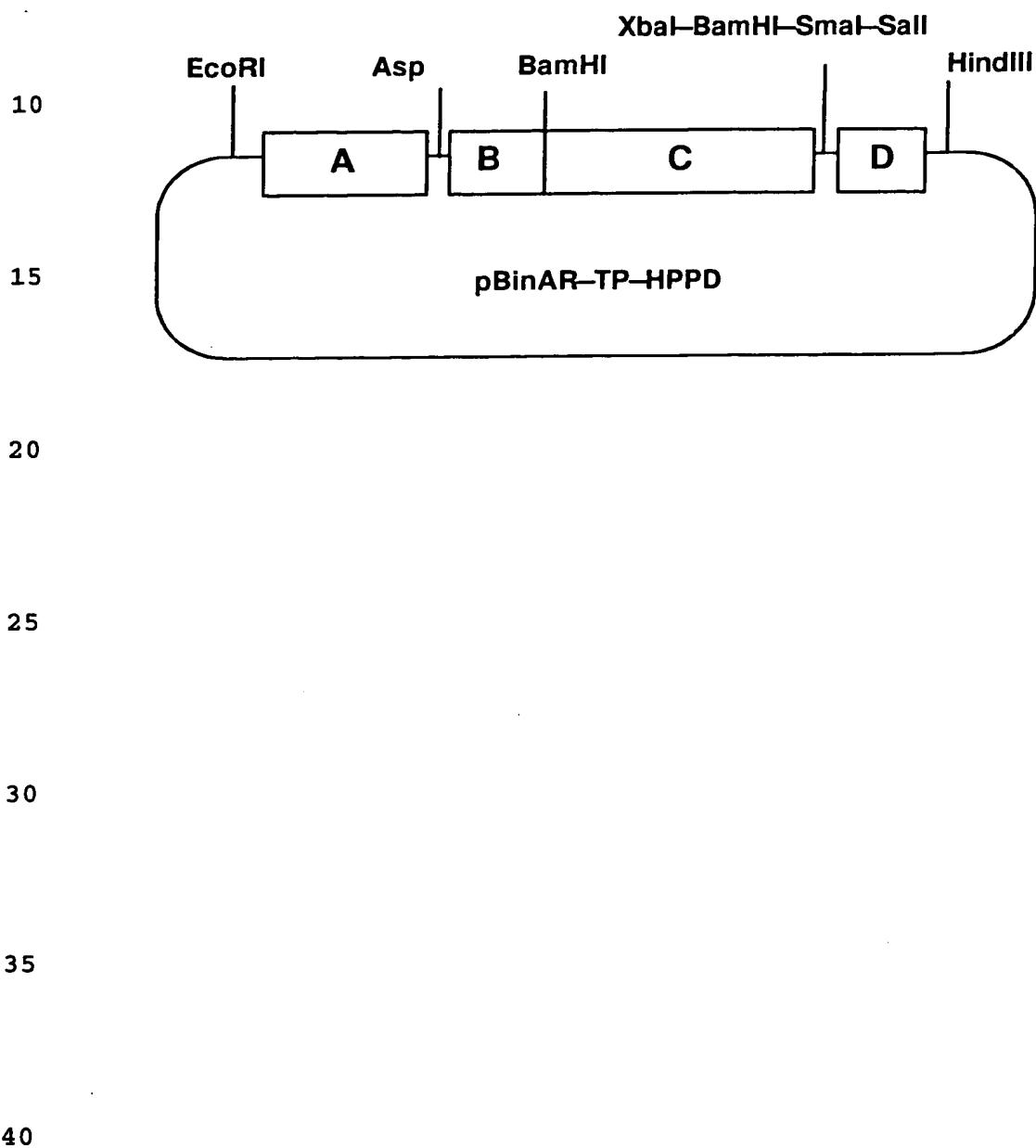
Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Zytosol transgener Pflanzen



01 23.10.90

Abbildung 6

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Steptomyces avermitilis* im Plastiden transgener Pflanzen

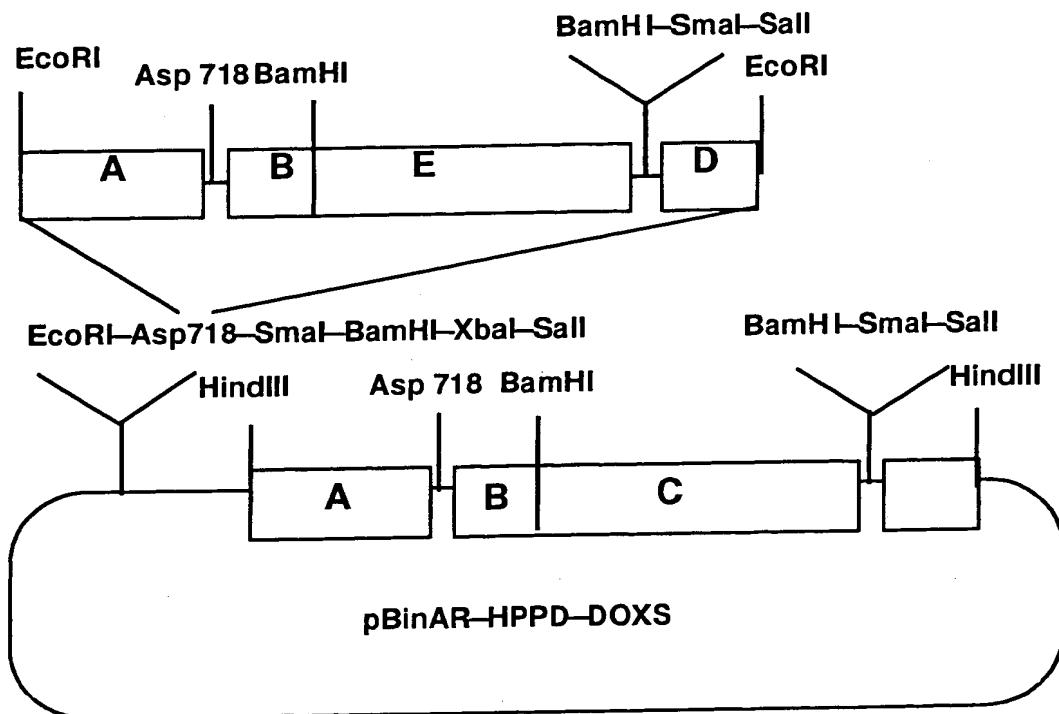


45

M 23. 10. 99

Abbildung

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-gens aus Streptomyces avermitilis und des DOXS-Gens aus E.coli in Plastiden transgener Pflanzen.



23.10.99

DNA-Sequenzen codierend für ein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gen und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen

5

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylo-
10 lose-5-Phosphat Synthase-Gens aus *E.coli* und einer p-Hydroxyphe-
nylpyruvat Dioxygenase aus *Streptomyces avermitilis*.

15

20

25

30

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)